Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. D. Plester

ENZYMHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AM INNENOHR VON GALLUS DOMESTICUS

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

LEONHARD BUHL
aus
Leinstetten

1980

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. D. Plester

ENZYMHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AM INNENOHR VON GALLUS DOMESTICUS

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

LEONHARD BUHL
aus
Leinstetten

1980

Dekan: Professor Dr. H. Heimann
Berichterstatter: Professor Dr. D. Plester

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (07472) 22145

PARENTIBUS MEIS

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Versuchstiere	15
2.2 Bezugsquellennachweis	16
2.3 Herstellung von nativen Gefrierschnitten	17
2.4 Histochemische Nachweisreaktionen	2o
2.4.1 Nachweis auf Dehydrogenasen	2o
2.4.2 Nachweis auf unspezifische Esterasen	24
2.4.3 Nachweis auf Proteasen	24
2.5 Dokumentation der Ergebnisse	26
2.6 Schnittserien paraffineingebetteter Präparate	26
2.7 Abkürzungen	26
3 ERGEBNISSE	27
3.1 Das Verhalten des Bogengangapparates und der Papilla neglecta bei den enzymhistochemischen Untersuchungen	28
3.2 Das Verhalten des Statolithenapparates bei den enzymhistochemischen Untersuchungen	33
3.3 Das Verhalten der akustischen Rezeptoren	4o
3.4 Das Verhalten weiterer wichtiger Strukturen des Innenohres	44
3.5 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse	45
4 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	46
5 ZUSAMMENFASSUNG	56
6 LITERATURVERZEICHNIS	59

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Erforschung des Gehörorganes der Vögel wurde bisher mit histologischen, morphologisch-anatomischen physiologischen und histochemischen Methoden durchgeführt. Dabei war das Interesse vor allem auf das Mittelohr und auf die Cochlea gerichtet, auf Strukturen, welche trotz anatomisch-morphologischer Unterschiede den Leistungen des menschlichen Ohres gleichkommen.

In der vorliegenden Arbeit sollen Resultate früherer Untersuchungen mit den durch diese speziellen histochemischen Untersuchungsmethoden gewonnenen Erkenntnisse erweitert werden und Parallelen zu höheren Wirbeltieren und zu phylogenetisch früheren Entwicklungsstufen aufgezeigt werden.

Schon im 17. Jahrhundert beschäftigten sich zwei Forscher mit der Anatomie des Gehörorgans der Vögel. (CASSERIUS, 1600, PERRAULT 1680). Ein erster Höhepunkt wird durch die klassischen Arbeiten von RETZIUS (1871) und von HASSE (1871) erreicht. Eine große Anzahl von Untersuchungen wurden in den zwanziger und dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts durchgeführt. In den sechziger Jahren erscheinen eine ausführliche Studie von SCHWARTZKOPFF und WINTER (1960) sowie erste elektronenmikroskopisch und histochemische Arbeiten.

I. Anatomie des Vogelohres

a. Embryologie

Die Anlage des Labyrinthes tritt zwei Tage nach Beginn der Bebrütung auf. Eine ektodermale Zellverdichtung wird zum Gehörbläschen, das sich in einen oberen und unteren Teil aufgliedert. Davon ausgehend bildet sich der in der Subduralregion des Gehirnes endigende Ductus endolymphaticus. Später entwickeln sich acht Sinnesepithelfelder mit ihren Begleitstrukturen, die Anschluß an den achten Hirnnerv erhalten. (HELD 1926, DE BURLET 1934, FRIEDMANN 1968)

b. Äußeres Ohr

Wie beim Säugetier setzt sich das Gehörorgan der Vögel aus äußerem, mittlerem und inneren Ohr zusammen. Der äussere Gehörgang, der die Form einer kurzen Röhre aufweist, wird von Weichteilgebilden der Haut, von Muskulatur und von knöchernen Wandabschnitten des Schädels gebildet. Die äußere Öffnung ist bei Gallus von Konturfedern verhüllt. Den inneren Abschluß bildet das Trommelfell.

c. Mittelohr

Das mittlere Ohr oder die Paukenhöhle stellt ein dreiseitig prismatischer Raum dar, der durch die Tuba auditiva mit der Rachenhöhle kommuniziert. Medialwärts verengt sie sich zum Recessus cavi tympani. (STRESEMANN 1934)

An seinem Boden befinden sich die Fenestra rotunda und die Fenestra ovalis. Quer durch die Paukenhöhle verläuft die Kolumella, ein dünnes Knorpelstäbchen, das beim Vogel vergleichbar der Gehörknöchelchenkette der Säuger die Schallenergieübertragung vom Trommelfell zum Innenohr übernimmt. Ihr mediales Ende sitzt auf dem beweglichen, knöchernen Abschluß der Fenestra ovalis, ihr distales läuft in drei knorpelige Fortsätze aus, welche mit dem Trommelfell und der Paukenhöhlenwand verbunden sind. (STELLBOGEN 193o, FREYE-ZUMPFE 1952-1953)
An diesem distalen Ende und am Trommelfell inseriert der M. tensor tympani. An die Paukenhöhle schließt sich medial das Innenohr an.

d. Innenohr

Das Labyrinth liegt tief in der seitlichen Schädelwand. Die das Labyrinth umgebenden Knochen beschreibt GADOW (1891). Ein System perilymphatischer Räume trennt das knöcherne vom membranösen Labyrinth. Über den Ductus perilymphaticus steht der perilymphatische Raum mit dem Liquor cerebrospinalis in Verbindung. (WERNER 1958)

Die Blutversorgung erfolgt über die Art. labyrinthi und die Art. cochlearis. Der venöse Abfluss weist bei den Vögeln verschiedene Variationen auf. (SNAPP 1924)

RETZIUS (1871) teilt das membranöse Labyrinth in eine Pars superior und eine Pars inferior ein. Die Pars superior besteht aus dem Utriculus, der Ampulla anteror mit Canalis semicircularis anterior, der Ampulla horizontalis mit Canalis s. horizontalis und der Ampulla posterior mit Canalis s. posterior. Die Pars inferior setzt sich aus Sacculus mit Ductus und Saccus endolymphaticus und aus der Cochlea zusammen. Die Cochlea wird von der Pars basilaris und der Lagena gebildet. Die Endolymphräume beider Teilstücke des Labyrinthes stehen durch den Ductus utriculo-saccularis miteinander in Verbindung.

An dem membranösen Gehörorgan sind insgesamt acht Nervenendstellen vorhanden, nämlich die Macula recessus utriculi, drei Cristae ampullarum, die Mac. sacculi, die Papilla basilaris, die Pap. lagenae und die Pap. neglecta. Der Utriculus bildet ein von kaudal nach rostral leicht ansteigendes Rohr. Sein vorderes Ende ist zu dem nach unten gerichteten, blasenförmigen Recessus utriculi aufgetrieben. Der Boden dieses Recessus wird von einer Nervenendstelle eingenommen, während von oben die Ampullen des vorderen und äußeren Bogenganges in ihn einmünden. Nach hinten gabelt sich der Utriculus in zwei weite Schläuche, den Sinus utriculi superior und den Sinus utriculi posterior.

Ersterer setzt sich unmittelbar in den hinteren Bogengang fort und nimmt das obere Ende des vorderen Bogenganges auf. Der Sinus utriculi posterior öffnet sich in die Ampulle des hinteren Bogenganges. Am Boden des Verbindungsstückes zwischen Sinus utriculi posterior und der Ampulle liegt als kleine Nervenendstelle die Papilla neglecta. Die drei Ampullen zeigen einen übereinstimmenden Aufbau; jede ist der Sitz einer Nervenendstelle, der Cristae ampullaris. Unter den Bogengängen ist der vordere der größte, der hintere meist der kleinste.

Der Sacculus ist ein kleines, dreieckiges Säckchen mit rostral gerichteter Spitze und kaudal abgerundeter Basis. Er schmiegt sich dem Boden des Utriculus an und ist durch den Ductus utriculo-saccularis mit diesem verbunden.

Die Mac. utriculi und die Mac. sacculi sowie Mac. lagenae zeigen einen einheitlichen Bau. Die Sinnes- oder Haarzellen tragen an ihrer Oberfläche Zilien, welche in die gelatinöse Membrana tectoria hineinragen. Diese ist hauptsächlich aus Mucopolysacchariden zusammengesetzt und wird von den dazwischenliegenden Stützzellen gebildet. Die Membran enthält zahlreiche Statoconien, Kristalle aus Kalziumkarbonat und zu einem geringen Teil aus Natriumkarbonat. (WERNER 1939)

Die Cristae der Ampullen haben die Form eines Kreuzes (septum cruciforme). Auf dem Längsbalken des Kreuzes liegt das Neuroepithel, das aus Haar- und Stützzellen besteht.

Der Querbalken des Kreuzes wird dagegen von einfachem Zylinderepithel bedeckt. An der Stelle des Otolithensäckchens tritt die Cupula terminalis auf. (KRAUSE 1922)

Diese Cupula terminalis wird in einem frühen ontogenetischen Stadium von den Stützzellen produziert. (SCHÖLZEL und LÜDTKE, 1967)

Das sich den Sinneszellen anschließende Epithel zeigt dunkle und helle Zellen, denen eine sekretorische und resorbierende Funktion zugeschrieben wird. (DOHLMANN et al. 1965, LÜDTKE und SCHÖLZEL 1966, ISHIYAMA et al. 1969)

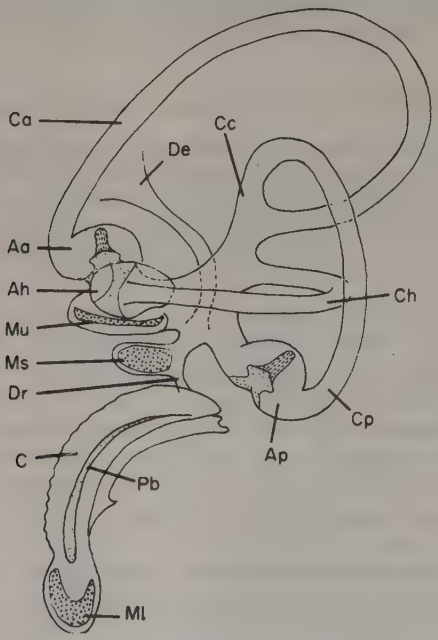


Abb.1.: Membranöses Labyrinth der Vögel, linke Seite, von lateral her gesehen
Aa = ampulla anterior, Ah = ampulla horizontalis
Ap = ampulla posterior, Mu = macula utriculi
Ms = macula sacculi, Ml = macula lagenae
C = cochlea, Pb = papilla basilaris
nach FARNER und KING (1973)

e. Cochlea

SCHWARTZKOPFF, J. und WINTER, P. (196o) untersuchen mit Hilfe des Mikroskopes zum ersten Mal die Cochlea am lebenden Tier, sie ist in besonderer Weise gekrümt: sie beschreibt von lateral nach ventral einen Bogen um die Unterseite des Schädels. In ihrem Inneren ist die Basilarmembran an zwei, sie der Länge nach begleitenden Knorpelschenkeln (Cartilago anterior, posterior) befestigt und mit diesen spiralig, annähernd um eine halbe Windung tordiert.

Bereich unter der Basilarmembran: Nach innen und außen liegen die Knorpelschenkel der knöchernen Cochlea ohne Zwischenraum an. Apikal wölben sich die Ränder der Spangen zunehmend nach oben und unten; im Bereich der Lagena schließen sie sich zusammen. Der innere Schenkel enthält das Ganglion cochleare und wird von den zur Basilarmembran und zur Lagena ziehenden Dendriten der Hörnervenzellen durchsetzt.

In den äußeren Knorpelschenkel tritt die Art. cochlearis ein, durchläuft ihn der Länge nach und geht im Bereich der Lagena auf den inneren Schenkel über, den sie ebenfalls durchläuft. Sie versorgt von beiden Schenkeln aus das Tegmentum vasculosum. Die Knorpelschenkel begrenzen zum überwiegenden Teil den Raum der Scala tympani.

Außerdem sind daran die Basilarmembran, der knöcherne Boden der Cochlea und das runde Fenster beteiligt. Die Gestalt der Schenkel bedingt einen wesentlichen Unterschied im Verlauf der Scala tympani der Vögel gegenüber der Säuger: schon vor dem apikalen Ende der Basilarmembran vereinigen sich die Knorpelspangen beider Seiten unter dieser, so daß über ihnen die Scala tympani einen Blindsack bildet. Dieser Teil wird Cavum scalae tympani bezeichnet. Entlang der Unterseite des Knorpelbodens dieses Blindsackes setzt sich die Scala tympani als eine Rinne fort, deren offene Seite von der knöchernen Wand der Cochlea begrenzt wird. Diese Fortsetzung der Scala tympani wird Ductus scalae tympani benannt, der zunächst unter dem Cavum sc. ty. entlang läuft, dessen Knorpelboden also ein "Zwischenboden" ist. In der Gegend des Überganges von Cochlea zu Lagena biegt der Ductus nach innen um und läuft dann unter und seitlich innen vom inneren Knorpelschenkel ein Stück zurück. Der Gang endet mit einem nach oben gerichtetem Abschnitt, der den inneren Knorpelschenkel kreuzt. Nach Passieren des inneren Knorpelschenkels öffnet sich der Ductus sc. ty. in den perilymphatischen Raum über der Basilarmembran und dem Tegmentum vasculosum. Diese Öffnung wird als Helicotrema bezeichnet.

Der an das Cavum sc. ty. nach basal anschließende unter der Basilarmembran verlaufende Abschnitt des perilymphatischen Raumes wird Scala tympani genannt. Sie erweitert sich in ihrem basalen Teil trichterförmig zu dem geräumigen Recessus scalae tympani, sein Flüssigkeitsinhalt übertrifft den der anderen Teile der Scala tympani. Die weite Öffnung des Trichters wird von der Membran des runden Fensters verschlossen. Quer über den Boden des Recessus sc. ty. verläuft ein Ast der Art. cochlearis. Er bildet dabei mehr oder weniger frei in der Perilymphe an Bindegewebszügen aufgehängte Knäuel. Vom Recessus sc. ty. geht nach basal der von DE BURLET (1934) beschriebene Ductus brevis ab, der als zweite Verbindung die perilymphatischen Räume unter und über der Basilarmembran kurzschließt.

Bereich des Ductus cochlearis: Die obere Begrenzung der Scala ty. und damit der Boden des mit Endolymphe gefüllten Ductus cochlearis bildet die Basilarmembran. Der endolymphatische Raum des Ductus cochlearis steht basal durch den Ductus reuniens mit den übrigen Räumen des Labyrinthes in Verbindung. Apical endet er blind in der Lagena. Sein Dach bilden die zahlreichen rundbogenartigen Falten des Tegmentum vasculosum. Die Oberfläche des unversehrten Tegmentum vasculosum erscheint glatt, ohne tiefere Einkerbungen. Durch das zarthyaline Gewebe

schimmern die in das Lumen des Ductus cochlearis hineinragenden Falten. Sie werden von der Art. cochlearis aus einzelnen mit Blutgefäßen versorgt. Die Wölbung des Tegmentum nähert sich bis auf etwa o,1 mm dem in gleicherweise gewölbten knöchernen Dach der Cochlea, mit dessen Endost es durch ein Maschenwerk von Fasern verbunden ist. Auch hier lassen sich dunkle und helle Zellen unterscheiden. (DOHLMANN 1965, 1969)

Die Basilarmembran, auf der die Pap. basilaris aufsitzt, reicht vom vorderen Knorpelschenkel, wo sie der dichten Knorpelplatte aufsitzt, über die Scala tympani bis zum hinteren Knorpelschenkel. Die Papilla basilaris ist aus Stütz- und Sinneszellen zusammengesetzt.

Nach Form und Größe können lange zylindrische und kurze breite Sinneszellen unterschieden werden. (TAKASAKA und SMITH, 1971)

Zur Befestigung der Membrana tectoria dienen sulamartige Epithelbezirke am vorderen und hinteren Knorpelschenkel. Sie senden lange Fortsätze in die extrazellulären Strukturen der Basilarmembran. Am inneren Schenkel trennen einige annähernd würfelförmige Zellen die Sinnes- und Stützzellen von den hyalinen Zellen. Diese Zellen sind von kubischer Gestalt, sitzen der Basilarmembran auf und reichen vom proximalen zum distalen Ende.

Durch akustische Schwingungen werden verschiedene Abschnitte der Basilarmembran frequenzabhängig erregt, wie von BEKESY (1944) beobachtet, und von MAZO (1955) und GOGNIASHVILII (1967) bestätigt wurde.

Die Erregung kommt durch eine Scherbewegung der Cilien zustande. Derselbe Mechanismus findet sich bei den Säugetieren, wie durch Ähnlichkeit verschiedener bioelektrischer und biochemischer Phänomene gezeigt wurde. Die Fähigkeit zur Frequenzanalyse scheint bei den Vögeln geringer zu sein, während die Unterscheidung von Lautstärken und Tonfolgen besser zu sein scheint. (PUMPHREY 1949, GRIFFIN 1953, THORPE 1961)

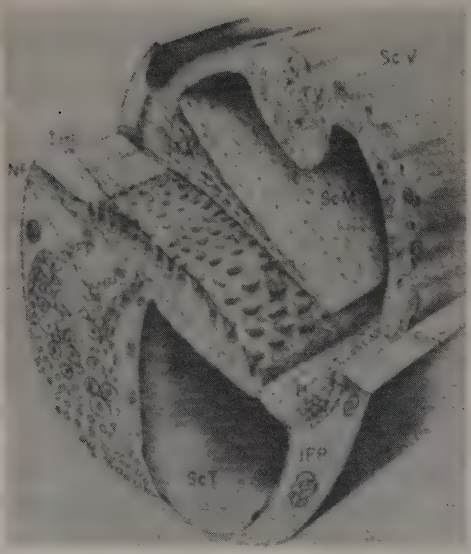


Abb. 2.: Cochlea der Taube, halbschematische Darstellung

ScV = scala vestibuli

TV = tegmentum vasculosum

ScM = scala media

TM = membrana tectoria

THC = hohe Sinneszellen

SHC = niedrige Sinneszellen

BM = membrana basilaris

IFP = äußerer Knorpelschenkel

SFP = innerer Knorpelschenkel

ScT = scala tympani

H = hyaline Zellen

nach FARNER und KING (1973)

Erläuterung der zu untersuchenden Enzymreaktionen

Den in dieser Arbeit untersuchten Enzymen kommen folgende unterschiedlichen biologischen Funktionen im Zellstoffwechsel zu: (HARPER et al. 1975).

Als Enzym des Krebs-Zyclus katalysiert die Succinatdehydrogenase die Dehydrierung von Succinat zu Fumarat durch ein Flavoproteinenzym, das in direkter Verbindung zur Atmungskette steht. Von den koenzymabhängigen Dehydrogenasen bewirkt die Glucose-6-phosphatdehydrogenase die Reaktion von Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphogluconolacton unter Gewinn von NADPH, ein wichtiger Reaktionsschritt des Pentosephosphat-Weges, der über NADPH mit der Fettsäure- und Steroidproduktion verbunden ist und über Pentosen mit der Nucleotid- und Nucleinsäurebiosynthese in Zusammenhang steht. Die Laktatdehydrogenase ermöglicht der Zelle, über anaerobe Glycolyse mit Bildung von Laktat eine Sauerstoffschuld einzugehen.

Mit der Glycerophosphatdehydrogenase besitzt die Zelle die Möglichkeit, aus einem Zwischenprodukt der anaeroben Glycolyse, dem Dihydroxyacetonphosphat, Glycerophosphat zu bilden, welches für die Fettsäuresynthese von Bedeutung ist; ebenso kann sie bei Katabolisierung der Fettreserven die anaerobe Glycolyse mit diesen Substraten speisen.

Von der Isocitronensäuredehydrogenase und auch von der Malatdehydrogenase ist bekannt, daß sie sowohl NAD-abhängig streng mitochondrial vorkommen, als auch in NADP-abhängiger Form sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien anzutreffen sind.

Die biologische Bedeutung der NAD-abhängigen Formen liegt in ihren Funktionen im Krebszyclus, aber auch - über das x-Ketoglutarat bzw. das Oxalacetat - in ihren Beziehungen zum Aminosäurestoffwechsel, da diese Produkte frei durch die Mitochondrienmembran diffundieren können.

Ebenfalls eine wichtige Rolle im Aminosäurestoffwechsel besitzt die Glutamatdehydrogenase, ein mitochondriales Enzym, das die dehydrierende Desaminierung des Glutamats bewirkt.

Die Reaktion auf unspezifische Esterase erfaßt eine inhomogene Gruppe ähnlich wirkender Enzyme, die die hydrolytische Spaltung von Carboxylsäureestern von Alkoholen, Phenolen und Naphtholen bewirken. Ester organischer Säuren geringer Kettenlänge werden bevorzugt von unspezifischer Esterase gespalten. Die Nachweise proteolytischer Aktivität mit dem Substrat APNE weist auf das Vorhandensein von Endopeptidasen hin, welche dieses Substrat bei Phenylalanin oder Arginin zu hydrolysieren vermögen, wie z. B. Chymotrypsin und Trypsin.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Zu den Untersuchungen wurden 35 Kücken (Gallus domesticus) im Alter von 2 Tagen bis 6 Wochen herangezogen. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 22 Grad C gehalten. Futter und frisches Wasser standen in ausreichenden Mengen zur Verfügung.

Die Kücken wurden mit Äther narkotisiert und durch Eintauchen des Kopfes in flüssige Luft getätet. In gefrorenem Zustand wurde mit Hilfe einer Bandsäge der Kopf vom Rumpf getrennt und dann in der Medianebene durchsägt. Der Schnabel und der größte Teil des Auges wurde ebenfalls entfernt. Die so entstandenen Flächen dienten der räumlichen Orientierung bei der Montage im Kryostat. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die so gewonnenen Präparate in gefrorenem Zustand belassen, wobei nie länger als ein Tag gewartet wurde. Um die Präparate vor Austrocknung zu schützen, wurden sie in feuchten Kammern aufbewahrt oder mit Parafilm umwickelt.

2.2 Bezugsquellennachweis

von C.F. Boehringer & Söhne, GmbH, Mannheim wurden bezogen:

Glucose-6-Phosphat (di-Natriumsalz)

DL-Glycerin-3-phosphat (tri-Natriumsalz)

Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (tri-Natriumsalz) NADP

Succinat (di-Natriumsalz)

Von Fluka AG wurden bezogen:

L(-)-Äpfelsäure

L-Glutaminsäure mono-Natriumsalz

Von Mann Research Labaratories, New York, wurden bezogen:

N-Acetyl-DL-Phenylalanin beta Naphthyl Ester (APNE)

Von E. Merck AG, Darmstadt, wurden bezogen:

Amobarbital (5-äthyl-5-isoamyl-Barbitursäure)

N, N-Dimethylformamid (DMFA)

Kaisers Glyceringelatine für die Mikroskopie

Propandiol- (1,2) (1,2-Propylenglycol)

Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Tris)

Von C. Roth OHG, Karlsruhe, wurden bezogen:
L(+)-Milchsäure Natriumsalz

Von Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg, wurden bezogen:
Fast Blue B salt (Diazo-echtblau B) C.I. 37235
DL-Isocitronensäure, tri-Natriumsalz
Naphthol-AS-D acetat
Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD)
p-Nitroblautetrazoliumchlorid (Nitro-BT)
Polyvinylpyrrolidon (PVP)

2.3 Herstellung von nativen Gefrierschnitten

Zur Gewinnung nativer Gefrierschnitte ist die von GIEBEL (1977) dargestellte Methode geeignet, zumal sie kurze Inkubationszeiten ermöglicht, was für die Interpretation von histochemischen Untersuchungen von großem Vorteil ist; dies war von GIEBEL und PLESTER (1971) bereits hervorgehoben worden.

Es fand der Kryostat WKF, Modell WK 115o, Brandau, Deutschland, mit Motorantrieb Verwendung. Es wurden Schnitte gewonnen in frontaler, horizontaler und sagittaler Ebene.

Dabei wurde das Präparat jeweils so ausgerichtet, daß die Kristallmassen der Otolithen parallel zur Messerkante lagen, und zwar so, daß sie vom Messer nicht in die zu untersuchenden Strukturen hineingetragen wurden und diese zerrissen.

Bei unentkalktem Material führen die großen Härtunterschiede der Gewebe zu einer Instabilität des Schnittes, wodurch es leicht zum Aufbrechen und Zerreißen des Schnittes kommt. Da ein Härteangleich der Gewebe mit fallender Temperatur erfolgt, wurde bei tiefer Temperatur geschnitten. Die besten Resultate waren bei - 2o° C Raumtemperatur und - 25° C bis - 3o° C Tischtemperatur zu erzielen.

Die Sprödigkeit des Objektes erfordert die langsamste Geschwindigkeit des Motorantriebes am Handrad, die zu dem noch gebremst und variiert wurde.

Zur Vermeidung von Deformierungen wurde das Objekt zu einer im Schnitt trapezförmigen Pyramide zurecht geschnitten. Die Schnittdicke betrug bei allen Schnitten 2o u.

Zur räumlichen Orientierung und zur Kontrolle der Schnittgeschwindigkeit diente ein Op-Mikroskop (OPMi Ul, Zeiss, Oberkochen, Deutschland).
Die Schnitte wurden durch kurzes Antauen auf einem Deckglas gestreckt.

Bei der beschriebenen Temperaturen führte die unterschiedliche Elastizität der geschnittenen Strukturen (Gehirn, Otolithenkristalle, Knochen, Knorpel) zum Zusammenrollen des Schnittes beim Antauen, was durch Gegenhalten eines gekühlten Metallstabes oder durch Überdecken des Schnittes mit einem zweiten Deckglas verhindert werden konnte.

Um Reaktionsintensitäten verschiedener Gebiete im Ohr vergleichen zu können, wurden sechs Schnitte aus unterschiedlichen Regionen auf einem Deckglas gruppiert. So war es möglich, mehrere lückenlose Serien eines Innenohres zur gleichzeitigen Färbung verschiedener Enzyme zu gewinnen.

Die Schnitte auf den Deckgläsern wurden bis zur Inkubation in gefrorenem Zustand in feuchten Kammern aufbewahrt.

2.4 Histochemische Nachweisreaktionen

Die Inkubation erfolgte durch Überschichten der Deckgläser mit 1,5 ml der jeweiligen Inkubationslösung. Zur Kontrolle wurden Ansätze ohne Substrat mitgeführt.

Bei allen Dehydrogenasen erfolgte die Inkubation bei 37° C, ebenso bei dem Proteasennachweis mit APNE. Dazu wurden Stamm- und Färbelösungen, wie auch Pipetten und Deckglasständer bei 37 ° C vorgewärmt.

Die Nachweisreaktion unspezifische Esterase fand bei Zimmertemperatur statt.

Zur Beendigung der Reaktion wurden die Schnitte mit 5 - 1o % Formaldehyd 1o min. lang behandelt und anschliessend für weitere 1o min. mit Aqua dem. gewässert.

Daraufhin wurden die Präparate mit Glyceringelatine eingedeckt.

2.4.1 Folgende D e h y d r o g e n a s e n wurden untersucht:

SDH = Succinat-Dehydrogenase (Succinat: (acceptor) oxidoreductase, (EC 1.3.99.1.)

Koenzymabhängige Dehydrogenasen:

LDH = Laktat-Dehydrogenase (L-Lactate: NAD oxidoreductase, (EC 1.1.1.27.)

MDH = Malat-Dehydrogenase (L-Malat: NAD oxidoreductase, (EC 1.1.1.37.)

GDH = Glycerin-phosphat-Dehydrogenase (L-Glycerol-3-phosphate: NAD oxidoreductase, (EC 1.1.1.8.)

G-6-PDH = Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (D-Glucose-6-phosphate: NADP oxidoreductase, (EC 1.1.1.48.)

ICDH = Isocitrat-Dehydrogenase (threo-Ds-Isocitrate: NAD (P) oxidoreductase (decarboxylating), (EC 1.1.1.41. bzw. 1.1.1.42.)

GlDH = Glutamat-Dehydrogenase (L-Glutamat: NAD (P) oxidoreductase (desaminating) (EC 1.4.1.3.)

Die Inkubationsmedien für die Dehydrogenasennachweise wurden nach den Angaben von PEARSE (1961, 1968) zusammengestellt:

SDH-Nachweis:

Die Stammlösung setzte sich zusammen aus:

o,75 ml Na-Succinat (di Na-Salz) o,2 M

o,75 ml Salzlösung:

2 ml o,25 M $CaCl_2$ x 6 H_2O

2 ml o,o5 M $MgSO_4$ x 7 H_2O

2o ml o,6 M $NaHCO_3$

8 ml o,o1 M $AlCl_3$ x 6 H_2O

68 ml Aqua dem.
o,2 ml KCN o,1 M
o,2 ml Amobarbital o,1 M

alle Substanzen wurden in Phosphatpuffer pH 7,6, 1/15 M gelöst.

Die Färbelösung bestand aus:

1,5 ml Nitro-BT o,o4 M in Phosphatpuffer pH 7,6, 1/15 M.

Stamm-, Färbelösung und Pipetten wurden getrennt bei 37° C vorgewärmt; die Lösungen wurden unmittelbar vor der Inkubation zusammengegeben. Die Inkubationszeiten betrugen zwischen 3o und 4o min.

Koenzymabhängige Dehydrogenasen-Nachweise:

Folgende Koenzyme kamen zur Anwendung:
NAD für LDH, MDH, GDH, GlDH;
NADP für G-6PDH;
NAD und NADP für ICDH.

(1) zur Stammlösung wurden folgende Lösungen zusammenpipettiert:

o,35 ml Phosphatpuffer pH 7,4, 1/15 M
o,1 ml $MgCl_2$ x 6 H_2O, o,o5 M
o,1 ml KCN, o,1 M
o,1 ml Amobarbital, o,1 M
und 75 mg PVP

in getrennte Gefäße wurden

(2) 7,o mg NAD bzw. 5 mg NADP und

(3) o,25 ml Nitro-BT, o,o4 M gegeben.

in ein weiteres Gefäß kamen

(4) o,1 ml folgender 1,o M Substratlösungen:

L-Glutamat (Na-Salz)

L-Lactat

Glucose-6-Phosphat (di-Na-Salz)

DL-Glycerin-3-phosphat

DL-Isocitronensäure (tri-Na-Salz Dihydrat)

Stammlösung, Färbelösung, NAD (P) und Substratlösung wurden bei 37° C vorgewärmt, ebenso die Pipetten. Unmittelbar vor der Inkubation erfolgte die Fertigstellung des Inkubationsmediums durch Zusammenschütten der vorbereiteten Lösungen.

Alle Substanzen waren in Phosphatpuffer pH 7,4, 1/15 M gelöst.

PH-Korrekturen erfolgten mit festem Tris bzw. mit 1 NHCl.

Die Inkubationszeiten betrugen bei LDH und MDH 1o bis 2o min., bei GlDH 2o bis 3o min. G-6-PDH und SDH wurden 3o bis 4o min. lang inkubiert. Die Inkubationszeit für GDH variierte zwischen 3o und 6o min., die für ICDH zwischen 4o und 5o min.

2.4.2 Nachweis auf unspezifische Esterasen:

Der Herstellung der Inkubationslösungen lagen die Angaben von BURSTONE (1957) zugrunde. In den Ansatz wurden unmittelbar vor der Inkubation folgende Lösungen pipettiert:

(1) Stammlösung: auf 4 mg Naphthol-AS-D-Acetat
    1,o ml Aceton
    1,o ml Propylenglykoll
    8,o ml Phosphatpuffer pH 6,5, 1/15 M
(2) Färbelösung: auf 1o mg Echtblausalz B (Fast Blue B)
    1,o ml DMFA

Nach dem Zusammengeben dieser Lösungen wurde abgefiltriert.

Zur Hemmung der Esterasereaktion mit Alkohol wurde der Ansatz folgendermaßen abgeändert:
    3,6 ml Phosphatpuffer und
    4,4 ml Alkohol, 5o %

PH-Korrekturen wurden mit festen Tris bzw. 1 N HCl durchgeführt.
Es wurde 5 bis 1o min. lang inkubiert.

2.4.3 Nachweis auf Proteasen

Der Nachweis auf Proteasen wurde mit dem Substrat APNE geführt, das Inkubationsmedium wurde nach Angaben von BRODMANN (1977) zusammengestellt.

Nachweis mit dem Substrat APNE:

Die Substratlösung enthielt
2,o mg APNE in
1,5 ml DMFA und
9,o ml Tris/HCl-Puffer pH 8,o, o,o5M.

Die Färbelösung bestand aus
4,o mg Fast Blue B salt, gelöst in
1,o ml Tris/HCl-Puffer pH 8,o, o,o5 M.

Substrat- und Färbelösung wurden direkt vor der Inkubation zusammengegeben.

Zur Hemmung der Reaktion mit Alkohol wurde die Puffermenge auf 4,4 ml Tris/HCl-Puffer beschränkt und 4,6 ml Äthanol (5o%) zugegeben.

Die Inkubationszeit betrug 15 bis 3o min.

Die Färbelösung enthielt
4,o mg Fast Blue B salt, gelöst in
1,o ml Tris/HCl-Puffer.

(Die Proteasennachweise mit den Substraten BANA und GluPNA blieben auch nach über zweistündiger Inkubation ohne Resultat).

2.5 Dokumentation der Ergebnisse:

Nach dem Eindecken mit Glyceringelatine wurden die Präparate umgehend photographiert. Es wurde dazu das Photomikroskop III, Zeiss, Oberkochen, verwendet. Die Aufnahmen wurden auf Agfachrome 5o L professional Filmen gemacht. Schwach kontrastierende Strukturen kamen mit Interferenzkontrast gut zur Darstellung.

2.6 Schnittserien paraffineingebetteter Präparate

Zur exakten Darstellung der anatomischen Verhältnisse wurden Serienschnitte in frontaler und sagittaler Richtung angefertigt. Hierzu wurden die formolfixierten Präparate 3 Wochen lang in EDTA entkalkt, in Praffin eingebettet und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Die Schnittdecke betrug 5 u.

2.7 Abkürzungen

APNE	N-Acetyl-DL-Phenylalanin-beta-naphthylester
DMFA	Dimethylformamid
NAD(P)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid(phosphat)
Nitro-BT	p-Nitroblautetrazoliumchlorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon

3 ERGEBNISSE

Es wurden Nachweisreaktionen auf die Enzyme LDH, GDH, G-6-PDH, SDH, MDH, ICDH und GlDH aus der Gruppe der Dehydrogenasen sowie auf unspezifische Esterase und auf unspezifische Proteasen mit dem Substrat APNE durchgeführt.

Die stärksten Farbintensitäten ergaben die Nachweise der Enzyme LDH, MDH, ICDH und GlDH. Hierbei stimmten auch die Aktivitätsunterschiede der einzelnen Strukturen recht gut überein.

Die schwächsten Anfärbungen ergaben sich beim Nachweis von GDH, den unspezifischen Esterasen und den Proteasen. Vergleichbar waren hier die Aktivitätsunterschiede der beiden letztgenannten Nachweisreaktionen.

Mittlere Aktivitäten ergaben sich beim Nachweis der G-6-PDH.

Die größten Aktivitätsunterschiede innerhalb der einzelnen Strukturen waren beim Nachweis von SDH festzustellen.

3.1 Das Verhalten des Bogengangapparates und der Papille neglecta bei den enzymhistochemischen Untersuchungen.

Besondere Beachtung fanden die Cristae ampullares in den Ampullen der Bogengänge und die sie umgebenden Epithelzonen. Dabei konnten an den Abhängen der Cristae in utriculopetaler und -fugaler Richtung zwei Epithelbezirke differenziert werden: die dem Sinnesepithel direkt benachbarte Übergangszone, an diese unmittelbar angrenzend das Planum semilunatum. Die Zellen der Übergangszone und des Planum semilunatum zeichneten sich histochemisch durch besonders starke Aktivitäten aus.

Bei Nachweis auf LDH konnte man besonders starke Aktivitäten in den basalen Anteilen des Planum semilunatum und in der Übergangszone beobachten. Das Sinnesepithel der Cristae ampullares ließ eine Reaktion im basalen und im apikalen Bereich erkennen. Das Sinnesepithel der Macula neglecta zeigte basal eine starke Anfärbung. Die sich an das Neuroepithel anschließende Zone wies ebenfalls eine starke Farbintensität auf.

Beim Nachweis der GDH ließ die Intensitätsverteilung ähnliche Resultate erkennen wie die der LDH. Insgesamt waren die Intensitäten jedoch viel geringer.

Beim Nachweis auf SDH fand sich eine geringe Anfärbung des Sinnesepithels. Die sich anschließende Übergangszone und das Planum semilunatum enthielten sehr starke Aktivität (Bild 3 b). Dieselben Resultate waren bei der Macula neglecta festzustellen.

Beim G-6-PDH-Nachweis trat im Bereich der Cristae ampullares dieselbe mittlere Intensität auf wie in der Übergangszone und im Planum semilunatum. Die Papilla neglecta zeigte apikal nur eine geringe Anfärbung.

Bei der Reaktion auf MDH reagierten im Bereich des Sinnesepithels die basalen Anteile am stärksten. (Bild 3) Die basalen Anteile der Übergangszone und des Planum semilunatum wiesen ebenfalls eine sehr starke positive Reaktion auf. Die Farbintensitäten der Papilla neglecta stimmten mit denen der Ampulla überein.

Beim Nachweis auf ICDH fanden sich, bei allgemein kräftiger Reaktion im Bereich des Sinnesepithels der Cristae, die apikalen Anteile stärker gefärbt. Die Übergangszonen und das Planum semilunatum verhielten sich in ihren basalen Anteilen stark positiv. Die Farbintensitätsunterschiede waren bei der Papilla neglecta dieselben, nur waren die Intensitäten insgesamt etwas geringer. (Bild 4)

GlDH- anzeigende Farbniederschläge fanden sich in den Ampullen im Planum semilunatum und in der Übergangszone, stärker im apikalen Anteil des Sinnesepithels. Bei der Pap. neglecta zeigte sich eine stärkere Anfärbung im basalen Bereich.

Bei der Reaktion auf unspezifische Esterase besaß das gesamte Sinnesepithel der Cristae schwache Aktivität. Das Planum semilunatum und die Übergangszone zeichneten sich durch eine stärkere Anfärbung aus.

Der Nachweis auf Proteasen mit APNE ergab die stärkste Aktivität in den Epithelzellen der Übergangszone und des Planum semilunatum. Die Sinnesepithelien der Cristae reagierten positiv. Die Pap. neglecta zeigte ebenfalls eine positive Reaktion.

Abb. 3 a, b:

Verteilung der enzymatischen Aktivität in den Cristae ampullares in Frontschnitten bei Schnittdicke 2o u bei den Nachweisen

a: auf MDH: Inkubationszeit 2o min., Abb. Maßstab 1oo:1

b: auf SDH: Inkubationszeit 5o min., Abb. Maßstab 1oo:1

Abkürzungen: SiE = Sinnesepithel, ÜZ = Übergangszone
N = Nerv, ps = planum semilunatum

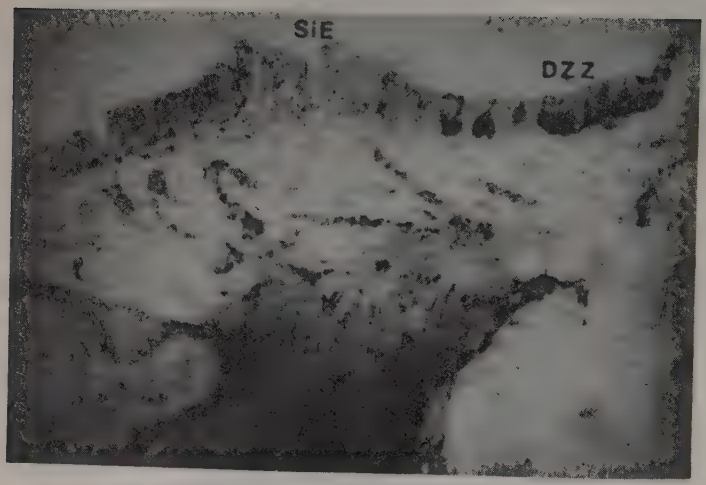


Abb. 4:

Verteilung der enzymatischen Aktivität im Bereich der Papilla neglecta in einem Sagittalschnitt bei Schnittdicke 2o u bei ICDH-Nachweis

Inkubationszeit 5o min., Abb. Maßstab 24o:1

Abkürzungen: SiE = Sinnesepithel, DZZ = Dunkelzellzone

N = Nerv

3.2 Das Verhalten des Statolithenapparates - Mac. utriculi, Mac. sacculi und Mac. lagenae, - bei den enzymhistochemischen Untersuchungen

Der Mac. utriculi direkt benachbart liegt eine Epithelzone, deren histochemisches Verhalten sich nur gering von dem des indifferenten Wandepithel unterschied. Dieser perimaculären Randzone schließt sich ein Epithelbezirk an, dessen histochemisches Verhalten sich nicht von dem der Übergangszone und dem Planum semilunatum der Ampullen unterschied. In Analogie zu entsprechenden Strukturen des Säugetierinnenohres wird dieser Bereich Dunkelzellzone genannt. Bei der Reaktion auf LDH zeichnete die Mac. utriculi eine sehr starke Intensität aus. Sehr starke Farbniederschläge waren in der Dunkelzellzone zu erkennen.

Das sich der Mac. sacculi anschließende Epithel unterschied sich nicht vom indifferenten Wandepithel. Auch im Sinnesepithel der Lagena wurde eine Betonung der apikalen Region nicht deutlich. (Abb. 7 b)

Beim GDH-Nachweis zeigten die Macula utriculi und sacculi basal eine mittelstarke Anfärbung. Das Sinnesepithel der Lagena war basal stärker gefärbt.

Bei der Reaktion auf SDH zeigte das sensorische Epithel der Mac. utriculi nur eine schwache Anfärbung im Gegen-

satz zur lebhaften Aktivität der im Utriculus gelegenen Dunkelzellzone. (Abb. 5 a) Ebenso schwach wie die Mac. utriculi fiel die Reaktion der Mac. sacculi und der Mac. lagenae aus.

Die Resultate des Nachweises auf G-6-PDH zeigten im Bereich der Macula utriculi und der Mac. sacculi eine mittlere Reaktion. Die Dunkelzellzone war stärker tingiert. Formazanniederschläge waren vor allem basal im Sinnesepithel der Lagena zu finden. (Abb. 5 c)

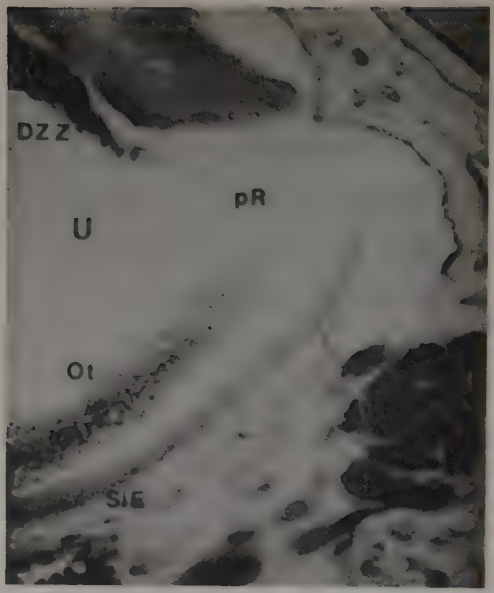
Beim MDH-Nachweis zeigte die Mac. utriculi eine mittlere Reaktion im Bereich der Dunkelzellenzone und in der apikalen Region des Sinnesepithels. Eine deutlich positive Reaktion fand sich im Bereich der basalen Zellanteile. (Abb. 5 b)
Die gleiche Polarisation der apikalen und basalen Partien des sensorischen Epithel ergab sich im Utriculus, wie auch in der Lagena.

Die Reaktion der ICDH fiel im Bereich des Utriculus in der Dunkelzellenzone stark positiv aus. Das Sinnesepithel der Mac. utriculi reagierte in allen Bereichen deutlich positiv. (Abb. 5 d) Ebenso verhielten sich die Sinnesepithelien der Mac. lagenae und der Mac. sacculi. (Abb. 7 a)

Beim Nachweis auf GlDH zeigten die Sinnesepithelien der Mac. utriculi und der Mac. sacculi die gleichen Farbverteilungen wie die der Cristae ampullaris. Hier waren die apikalen und basalen Strukturen des Sinnesepithels stärker angefärbt. Stärker positiv fiel der Nachweis in der Dunkelzellenzone des Utriculus aus. Schwach tingiert war das perimaculäre Randepithel des Utriculus.

In gleicher Weise wie Utriculus und Sacculus reagierte die Lagena. Unspezifische Esterase ließ sich in der Dunkelzellenzone des Utriculus nachweisen. In Mac. utriculi und Mac. sacculi ergab sich eine basale Betonung der Farbintensität, die der Dunkelzellenzone des Utriculus gleichkam. Das die Mac. sacculi und Mac. utriculi umsäumende Randepithel zeigte nur eine geringe Aktivität. Schwächer als im Utriculus war die Anfärbung in der Lagena.

Der Nachweis auf Endopeptidasen mit APNE ergab in den Sinnesepithelien von Mac. utriculi, Mac. sacculi und Mac. lagenae eine mittlere Intensität. Stark positiv verhielt sich die Dunkelzellenzone des Utriculus. Die perimaculäre Randzone wies eine mittlere Intensität auf.



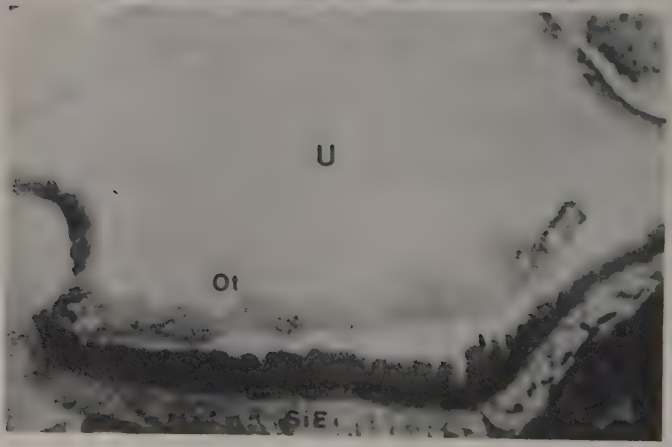


Abb. 5 a, b:
Verteilung der enzymatischen Aktivität im Bereich der Macula utriculi in Sagittalschnitten bei Schnittdicke von 2o u bei den Nachweisen
auf SDH: Inkubationszeit 5o min., Abb. Maßstab 1oo:1
auf MDH: Inkubationszeit 2o min., Abb. Maßstab 1oo:1
Abkürzungen: SiE = Sinnesepithel, Ot = Otolithen,
N = Nerv, pR = perimaculäre Randzone,
DZZ = Dunkelzellzone

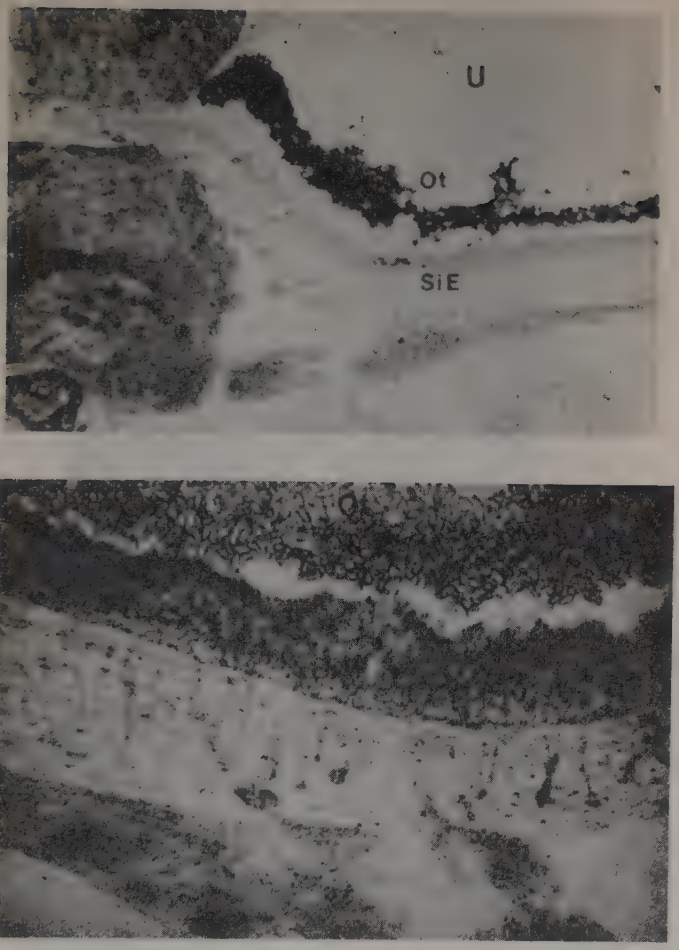


Abb. 5 c, d:
Verteilung der enzymatischen Aktivität im Bereich der Macula utriculi in Sagittalschnitten bei Schnittdicke von 2o u bei den Nachweisen
auf G-6-PDH: Inkubationszeit 6o min., Abb. Maßstab 1oo:1
auf ICDH: Inkubationszeit 4o min., Abb. Maßstab 24o:1
Abkürzungen: Ot = Otolith, N = Nerv, SiE = Sinnesepithel

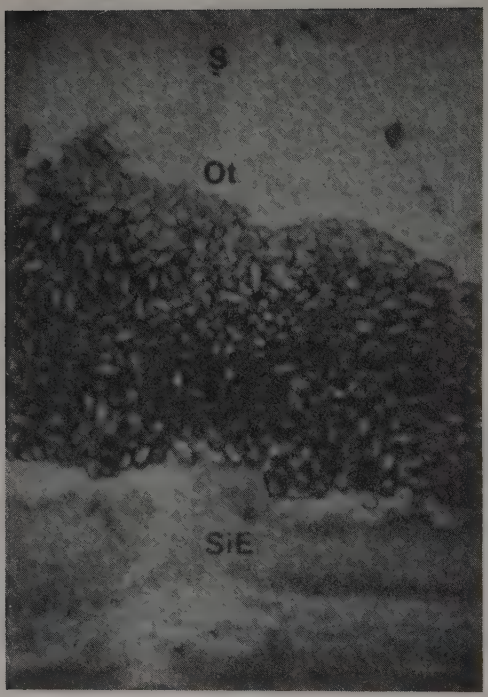
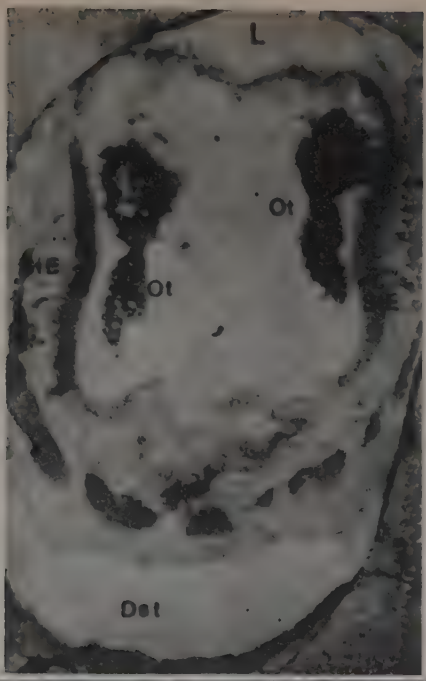


Abb. 6:
Verteilung der enzymatischen Aktivität im Bereich der Macula sacculi in einem Sagittalschnitt bei Schnittdicke von 2o u bei GlDH-Nachweis
Inkubationszeit 3o min., Abb. Maßstab 24o:1
Abkürzungen: SiE = Sinnesepithel, Ot = Otolith



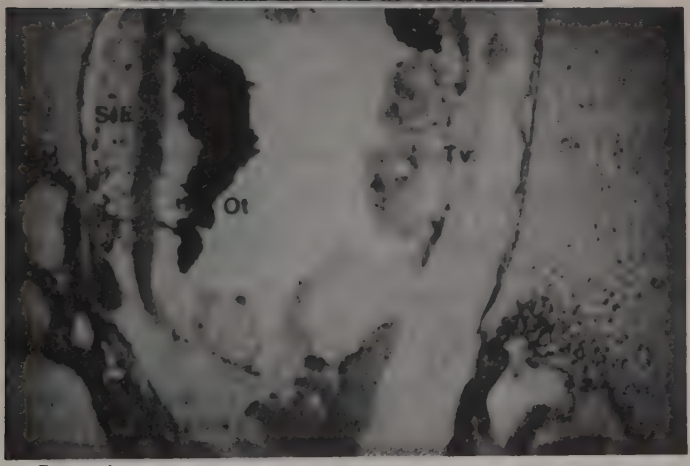


Abb. 7 a, b:

Verteilung der enzymatischen Aktivität im Bereich der Macula lagenae in Sagittalschnitten bei Schnittdicke von 2o u bei den Nachweisen

auf ICDH: Inkubationszeit 4o min., Abb. Maßstab 1oo:1

auf LDH: Inkubationszeit 1o min., Abb. Maßstab 1oo:1

Abkürzungen: SiE = Sinnesepithel, Ot = Otolith, Tv = Tegmentum vasculosum, Dst = Ductus scalae tympani, L = Lagena

3.3 Das Verhalten der akustischen Rezeptoren
- der Papilla basilaris -

Beim LDH-Nachweis färbte sich das Sinnesepithel gleichmäßig an. Es zeigte eine mittlere Intensität. Die inneren und äußeren homogenen Zellen waren basal besonders stark tingiert. Das Tegmentum vasculosum reagierte ebenfalls besonders stark. Dieselbe Reaktionsintensität zeigte eine Zellgruppe am Boden der Scala tympani. (Abb. 8 a)

Auf den GDH-Nachweis reagierte das Sinnesepithel mit einer geringen Anfärbung. Die äußeren homogenen Zellen zeigten eine etwas stärkere Anfärbung. Die stärkste Reaktionsintensität war beim Tegmentum vasculosum zu finden.

Bei der Reaktion auf SDH ergab sich die heftigste Reaktion beim Tegmentum vasculosum und bei den Zellgruppen am Boden der Scala tympani. Die homogenen Zellen zeigten eine geringe basale Anfärbung. Bei der Papilla basilaris war eine mittlere Reaktionsintensität festzustellen. (Abb. 8 b)

Beim Nachweis auf G-6-PDH zeigte die Papilla basilaris eine mittlere Intensität. Die stärkste Reaktion war beim Tegmentum vasculosum vorhanden. Die äußeren hylinen Zellen waren ebenfalls stärker tingiert.

Beim MDH-Nachweis war eine Betonung der apikalen Region der Papilla basilaris zu erkennen. Die stärkste Reaktion war beim Tegmentum vasculosum zu finden. Auf den Nachweis auf ICDH hin zeichnete sich die Papilla basilaris durch eine deutliche Reaktion aus. Dieselbe heftige Reaktion wie das Tegmentum vasculosum zeigten die inneren und äußeren homogenen Zellen. Etwas schwächer tingiert waren die Zellen am Boden der Scala tympani sowie die äußeren hyalinen Zellen.

Mittelstarke Anfärbungen ergab der Nachweis auf GlDH in der Papilla basilaris. Die inneren und äußeren homogenen Zellen waren vor allem basal stark tingiert. Dieselben starken Reaktionsintensitäten waren am Boden der Scala tympani zu finden.

Die unspezifische Esterase zeigte eine mittelstarke Anfärbung in der Papilla basilaris. Die stärkste Reaktionsintensität war beim Tegmentum vasculosum zu finden. Eine starke Anfärbung war auch bei den äußeren homogenen Zellen festzustellen.

Der Nachweis der Endopeptidasen mit APNE ergab die stärkste Reaktion beim Tegmentum vasculosum. Die Papilla basilaris war mittelstark tingiert. Eine starke Anfärbung konnte bei den äußeren homogenen Zellen festgestellt werden ebenso wie bei Zellen am Boden der Scala tympani.

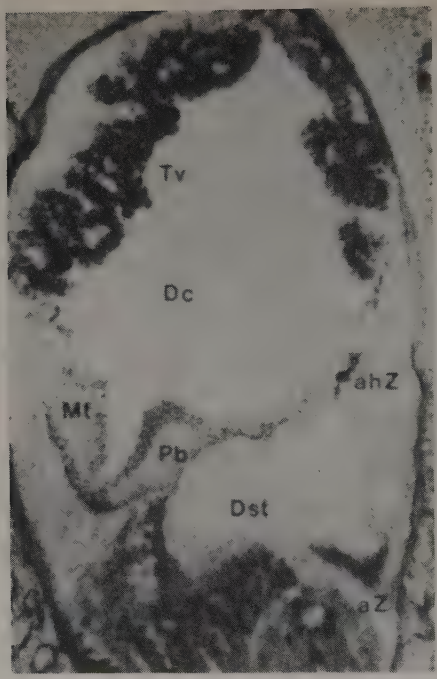


Abb. 8 a:
Verteilung der enzymatischen Aktivität im Bereich der Papilla basilaris in einem Frontalschnitt bei Schnittdicke von 2o u bei LDH-Nachweis
Inkubationszeit 15 min., Abb. Maßstab 1oo:1
Abkürzungen: Tv = Tegmentum vasculosum, Dc = Ductus cochlearis, Mt = Membrana tectoria, Pb = Papilla basilaris, ähZ = äußere homogene Zellen, Dst = Ductus scalae tympani, aZ = aktive Zellen am Boden der Scala tympani

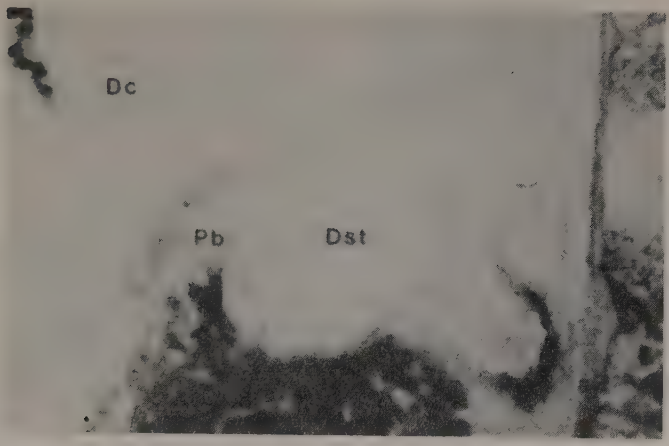


Abb. 8 b:
Verteilung der enzymatischen Aktivität im Bereich der Papilla basilaris in einem Frontalschnitt bei Schnittdicke von 2o u bei SDH-Nachweis
Inkubationszeit 5o min., Abb. Maßstab 24o:1
Abkürzungen: Dc = Ductus cochlearis, Pb = Papilla basilaris, Dst = Ductus scalae tympani,
aZ = aktive Zellen am Boden der Scala tympani

3.4 Das Verhalten weiterer wichtiger Strukturen des Innenohres

In allen Nachweisen zeigten die Cupulae der Cristae ampullares, die Otolithenmembranen von Macula utriculi, sacculi und lagenae, wie auch die Tektorialmembran der Papilla basilaris in keinem Fall eine enzymatische Aktivität.

Die indifferenten endolymphatischen Epithelien zeigten fast immer nur eine sehr schwache Anfärbung, mit Ausnahme der Nachweise auf G-6-PDH und SDH, bei welchen sie ganz ungefärbt blieben.

Die perilymphatischen Wandzellen reagierten einerseits schwach positiv, wie bei den Nachweisen auf ICDH, GlDH, GDH und Proteasen andererseits vollständig negativ wie auf LDH, G-6-PDH, SDH und MDH.

Mittlere bis starke Aktivitäten fanden sich bei allen Nachweisreaktionen in den Ganglienzellen.

3.5 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse

	LDH	GDH	G6PDH	SDH	MDH	ICDH	G1DH	unsp. Ester.	Prot.mit APNE
Cristae ampullares									
Sinnesep. apikal	+++	++	++	+	++	++	+++	+	+
basal	+++	++	++	+	++	++	+++	+	+
Übergangszone	+++	+	++	++	+++	++	++	++	++
Dunkelzellzonen	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Planum semilunatum	+++	++	++	+++	+++	++	+++	++	+++
Macula utriculi									
Sinnesep. apikal	+++	++	++	+	++	+++	++	++	++
basal	+++	+	++	+	+++	+++	++	+	++
perimac.Randzone	++	++	++	(+)	++	++	+	++	+++
Dunkelzellzone	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Macula sacculi									
Sinnesep. apikal	+++	++	++	+	++	++	++	+	+
basal	+++	+	++	+	++	++	++	++	++
perimac. Randzone	++	(+)	(+)	(+)	++	+	+	(+)	+
Tegmentum vasculosum	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Macula lagenae									
Sinnesep. apikal	+++	+	+	+	+++	++	+++	+	+
basal	+++	++	++	+	++	++	++	++	++
Papilla basilaris									
Sinnesep. apikal	++	++	++	++	++	++	++	++	++
basal	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Membrana bas.	+	(+)	o	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)
äuß.homog.Zellen	+++	++	+++	(+)	+++	+++	+++	+++	+++
inn.homog.Zellen	+++	(+)	+	(+)	+++	++	++	++	++
Papilla neglecta									
Sinnesep. apikal	++	+	+	+	++	+	+	+	+
basal	++	+	++	+	+++	+	+	+	++
Dunkelzellzone	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++
ind. endolymph. Epi.	(+)	(+)	o	o	(+)	+	(+)	(+)	+
perilymph. Wandzellen	o	+	o	o	o	+	+	(+)	+
Ganglienzellen	+++	++	++	++	+++	+++	++	+++	++
Inkubationszeiten	1o-2o	3o-6o	3o-5o	3o-4o	1o-3o	4o-5o	2o-3o	1o-15	15-3o

o Keine Reaktion, (+) unsichere Reaktion, + schwache Reaktion, ++ mittlere Reaktion, +++ starke Reaktion

4 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Um enzymhistochemische Untersuchungen durchführen zu können, ist es von besonderer Bedeutung, Verhältnisse anzutreffen, die dem lebendem Gewebe sehr nahe kommen. So wurde von GIEBEL und PLESTER (1971) darauf hingewiesen, daß nur Enzymnachweise an nativen Schnitten eine Aussage zulassen, da besonders coenzymabhängige Dehydrogenasen durch Fixieren und Entkalken stark beeinträchtigt werden. Um diese Voraussetzung zu erfüllen, wurde die oben beschriebene Gefriertechnik angewandt. Sie bietet eine gute Möglichkeit, um unfixierte und unentkalkte Gefrierschnitte zu erhalten, die Struktur ausreichend zu bewahren und mit kurzen Inkubationszeiten auszukommen.

Im Innenohr des Huhnes ließen sich in quantitativer Hinsicht alle untersuchten Enzyme nachweisen, in qualitativer Hinsicht ergaben sich deutliche Unterschiede.

Beim Vergleich der Stärke der abgelaufenen Enzymreaktion wurde der bei jedem Enzym am stärksten reagierende Epithelabschnitt als Ausgangswert gewählt. Mit diesem Epithelbezirk starker Reaktion wurden andere Epithelbezirke gleichstarker oder schwächerer Reaktion verglichen, wodurch sich

die Abstufung starke, mittlere, schwache, unsichere und keine Reaktion ergab. Bei allen Enzymen waren die am stärksten reagierenden Strukturen das Tegmentum vasculosum, die Regio secretoria um die jeweilige Cristae ampullaris und ein sich dem Utriculus anschließender Epithelbereich.

SCHWERT, NEURATH und KAUFMANN (1948) zeigten, daß für den Nachweis chymotryptischer Aktivität Esterverbindungen mit der Carboxylgruppe der spezifischen Aminosäure (wie Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin) größere Empfindlichkeit besitzen als die entsprechenden Amidderivate.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die spezifischen Nachweise proteolytischer Aktivität mit dem Aminosäureester APNE geführt, wobei sich APNE für den Nachweis chymotryptischer Aktivität eignet, allerdings auch von Trypsin und Esterase gespalten wird. So besteht durchaus die Möglichkeit, daß sich unter dem Einfluß einer Esteraseaktivität der auf proteolytische Aktivität spezifische Nachweis mit APNE verfälscht.

Quantitative Untersuchungen von BRODMANN und GIEBEL (1978) erbrachten ein Verhältnis der Aktivitäten von Chymotrypsien und Esterase gegenüber APNE von 55:1, was bedeutet,

daß APNE von Chymotrypsin 55 mal schneller gespalten wird als Esterase. Somit dürfte der weit überwiegende Teil der APNE-Spaltung bei den angewandten kurzen Inkubationszeiten auf proteolytische Aktivität zurückzuführen sein.

Die histochemischen Ergebnisse lassen erkennen, daß die Zellen der Sinnesepithelien sowie der spezifisch differenzierten Epithelien des endolymphatischen Raumes die Fähigkeit der Energiegewinnung über die Glykolyse und den Citratcyclus besitzen.

Die für den Citratcyclus charakteristischen Enzyme, MDH, ICDH und SDH finden sich in den spezifisch differenzierten Epithelien des endolymphatischen Raumes in großer Menge, SDH tritt allerdings in den Sinnesepithelien in geringerer Menge auf. Dabei kommt der SDH eine Kontrollfunktion des Citratcyclus zu. So liegt auf der Stufe der SDH der letzte physiologisch wichtige Kontrollpunkt des Citratcyclus, wobei das Enzym durch Oxalacetat im Sinne eines "feedback" gehemmt wird.

Unter anaeroben Bedingungen wird LDH zur Umwandlung von Pyruvat zu Lactat benötigt. Dieses Enzym ist in allen Epithelien in großer Menge vorhanden, so daß bei den einzelnen Epithelien der Glucoseabbau über die anaerobe Glycolyse ablaufen dürfte.

Die Zellen des Labyrinthes von Huhn sind auch zur Nucleinsäurebiosynthese und zur Stereoidproduktion befähigt. Das ergibt sich daraus, daß sich in allen Epithelbereichen G-6-PDH sicher nachweisen läßt. Von den Enzymen des Aminosäurestoffwechsels, MDH und GlDH, und die Proteasen zeigten in den basalen Sinnesepithelbereichen eine mittelstarke bis starke Reaktion, was auf eine sekretorische Aktivität auch der Stützzellen hinweisen könnte. Diese Meinung vertritt auch SCHÄTZLE in seinem Handbuch "Histochemie des Innenohres". (1971)

Ergebnisse früherer enzymhistochemischer Untersuchungen am Innenohr höherer Wirbeltiere können in qualitativer Hinsicht durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden.

Da größtenteils aber mit anderen Methoden gearbeitet wurde und eine uneinheitliche Nomenklatur, vor allem in den niedereren Tierklassen eine Interpretation erschwert, müssen Vergleiche in quantitativer Hinsicht kritisch betrachtet werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Untersuchungen am vestibulären Labyrinth des Meerschweinchens von NOMURA und BALOGH (1964) ergaben sich bei den entsprechenden Strukturen und gleichen Enzymen keine grundlegenden Unterschiede.

BRUDER (1978) führte Untersuchungen am Innenohr der Forelle durch. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit ergaben sich entscheidende Differenzen nur bei GlDH und G-6-PDH. BRUDER stellte die Vermutung an, daß bei niedereren Wirbeltieren der Pentosephosphatcyclus in geringerem Ausmaß, der Aminosäurestoffwechsel in stärkerem Ausmaß ablaufen würde.

Die vorliegenden Ergebnisse über die Enzymverteilung in der Cochlea stimmen recht gut mit denen von WEBSTER (1968) überein. Er verglich die Aktivitäten einiger Dehydrogenasen im Innenohr von Dipodymus spectabilis. Hier waren die am stärksten reagierenden Bezirke bei allen Tieren die Stria vascularis gefolgt vom Cortischen Organ, beim Huhn ist das Tegmentum vasculosum der Ort der stärksten Reaktion, gefolgt vom Neuroepithel.

SCHÄTZLE (1966) wies unspezifische Esterase in der Meerschweinchenschnecke nach. Dabei reagierten die Deiters- und Hensen-Zellen, die Zellen des Sulcus spiralis externus und der Stria vascularis sehr stark positiv. Bei der vorliegenden Arbeit reagierten die äußeren homologen Zellen sowie das Tegmentum vasculosum stark positiv. Die Haarzellen zeigten eine mittlere Aktivität. NOMURA (1969) fand dagegen keine Esteraseaktivität in der Stria vascularis des Meerschweinchens.

GERHARDT (1964) wies G-6-PDH in der Meerschweinchenschnecke nach. Wie auch bei der vorliegenden Arbeit fielen die Reaktionen insgesamt nicht sehr stark aus. Eine positive Reaktion wurde nur in den Zellen des Cortischen Organes und des Ganglion spirale festgestellt, in der Stria vascularis fehlte sie. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, wo das Tegmentum vasculosum die stärkste Aktivität zeigte.

Untersuchungen über SDH am Innenohr wurden von SPOENDLIN (1963, 1964), QUADE und GEYER (1973), ISHIYAMA (1969) und VOSTEEN (1955) vorgenommen. Bei allen diesen Untersuchungen wurden die stärksten Aktivitäten jeweils in der Stria vascularis, etwas schwächer in den Sinnesepithelien. Die Ergebnisse decken sich mit denen der vorliegenden Arbeit.

PLESTER (196o) und PLESTER et al. (1962) führten autoradiographische Untersuchungen über den Eiweißstoffwechsel der Cochlea des Meerschweinchens und der Taube durch. Sie fanden einen hohen Eiweißumsatz in den Ganglienzellen, einen niedrigeren in den Sinneszellen und einen geringen in den Zellen des Tegmentum vasculosum. Kein Eiweißumsatz war in der Membrana tectoria festzustellen.

Diese autoradiographisch ermittelten Umsätze der Ganglienzellen, der Sinneszellen und der Membrana tectoria stimmen

mit den gefundenen enzymatischen Aktivitäten überein, die Zellen des Tegmentum vasculosum erreichten jedoch die Aktivität der Ganglienzellen.

Besondere Schwierigkeiten ergeben sich beim Vergleich der Untersuchungsergebnisse der Epithelzonen der Ampullen, da hier die Nomenklatur sehr unterschiedlich ist. Insbesondere der von STREIFENSAND (1835) mit Planum semilunatum bezeichnete Epithelbezirk wird unterschiedlich weit gefaßt. Diese Zone wird im allgemeinen mit Resorptions- und Sekretionsprozessen in Verbindung gebracht. Das scheint stammesgeschichtlich insofern von Bedeutung als bei niederen Wirbeltieren eine Schnecke mit entsprechenden Sekretionsbezirken wie Stria vascularis, Prominentia spiralis und Sulcus spiralis externus fehlt. So scheint der von BORGHESAN (1962) als "Pavement of planum" bezeichnete Epithelbezirk der von IWATA (1924) bei der Fledermaus benannten Regio secretoria zu entsprechen, die an den Abhängen der Cristae und um die Maculae gelegen, sich lichtmikroskopisch ähnlich den Zellen der Stria vascularis verhält. KIMBURA, LINDQUIST und WERSÄLL (1964) fanden elektronenmikroskopisch beim Meerschweinchen gegenüber den Zellen der Stria vascularis doch erhebliche Unterschiede und bezeichneten die Epithelzonen um die Cristae neutraler als Dunkelzellenzone. DE BURLET (1934) beschrieb unter dem Begriff Regiones secretoriae

entsprechende Epithelien am Frosch und HAZAMA (1929) an der Forelle.

Nach RUDERT (1966) umfaßt der Begriff Regio secretoria beim Meerschweinchen die Übergangszone, das Planum semilunatum und die "dunklen Zellen".

Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen von BORG-HESAN (1961) am Hasen sind die Zellen an der Cristabasis recht unterschiedlich und teilweise mit Vesikeln und Granula vollgepfropft, was nur auf Sekretion hinweisen kann. Auch DOHLMANN, OMEROD und Mc LAY (1959) kamen zu dem Schluß, daß um die Cristae ein Sekretionsgebiet liegt.

Nach einer Arbeit von NAKAI und HILDING (1968) legen die strukturellen Eigenschaften der dunklen Zellen der Ampulle den Gedanken nahe, daß sie an der Produktion von Endolymphe teilnehmen. DOHLMANN (1964, 1969) kam zu dem Schluß, daß die hellen Zellen eine sekretorische, glykoproteinproduzierende, die dunklen Zellen eine exkretorische und ionentransportierende Funktion haben. Bestärkt wird die Annahme, daß diese Zellen an Sekretionsvorgängen teilnehmen, durch die vorliegende Arbeit insofern, als diese Epithelbezirke beim Huhn, rückschließend auf die hohe Enzymkonzentration, neben den Sinnesepithelien sehr stoffwechselaktiv sind. Daß die ablaufenden Stoffwechselvor-

gänge in diesen beiden Epithelbereichen, obwohl mit derselben Enzymkonzentration ausgestattet, nicht derselben Funktion dienen können, unterstützen die elektronenmikroskopische Untersuchungen von BAIRATI und IURATO (196o) am Planum semilunatum der Ratte, von KIMURA, LUNDQUIST und WERSÄLL (1964) am sekretorischen Epithel des Meerschweinchens und von LÖWENSTEIN, OSBORNE und WERSÄLL (1964) am Sinnesepithel des Rochens, von RAUCHBACH und ARENBERG (1972) am Hai, wonach es sich um völlig unterschiedliche Zellstrukturen handelt. KIMURA, LUNDQUIST und WERSÄLL (1964) sowie MIRA und DAL NEGRO (1969) betrachten die Zone zwischen Sinnesepithel der Cristae ampullares und den Regiones secretoriae als Übergangszone. In der vorliegenden Arbeit wird die Nomenklatur von RUDERT (1966) benutzt.

Unter der Voraussetzung, daß den Zellen der Übergangszone eine sekretorische Funktion zukommt, wie ISHIJAMA, CUTT und KEELS (197o) nach phasenkontrast- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Schwein berichten, wird die These von SCHÄTZLE (1971) erhärtet, wonach auf niederer Differenzierungsstufe die Stützzellen nicht nur stützende Funktion besitzen, sondern ihnen auch eine sekretorische Aufgabe zukommt. Diese wird im Zuge der Entwicklung zur Säugetiercochlea an die Limbusepithelien abgegeben. In den Limbusepithelien wies IURATO (196o)

Granula nach. Nach Meinung SCHÄTZLE's (1971) scheint diese primitive Doppelfunktion in den Stützzellen des Vestibularapparates der Säugetiere noch erhalten zu sein, was durch die Untersuchungen von WERSÄLL (1956, 1967) und BAIRATI (196o) an den Stützzellen der Cristae ampullaris des Meerschweinchens bestätigt wird. Ebenfalls an den Stützzellen, sowohl des Cortiorganes als auch der Papilla basilaris bei den Vögeln wiesen JAHNKE, LUNDQUIST und WERSÄLL (1969) elektronenmikroskopisch Granula und Vesikel nach.

Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit weder eine Ansammlung von Enzymen in einer Cupula- oder Maculagallerte, wie sie SCHÄTZLE (1971) beim Nachweis alkalischer Phosphatase beim Meerschweinchen fand, noch eine Anreicherung einzelner Enzyme in der Otolithenmembran, wie HAGMANN (1977, 1978) beim Frosch angibt, beobachtet werden. Zwischen den Sinnesepithelien und den Otolithen und zwischen den Sinneszellen der Cristae ampullares und der Capulae befindet sich ein loses Netzwerk eines Deckgewebes, in das die Stereo- und Kinozilien der Haarzellen hinein ragen (WEVER 1973 a). Durch Bewegungen dieser Schicht werden die Haar- und Sinneszellen erregt. In dieser Deckschicht konnte genausowenig wie in der Otolithenmembran eine Enzymanreicherung gefunden werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

An unfixierten und unentkalkten Gefrierschnitten wurden die einzelnen Epithelbezirke des Innenohres enzymhistochemisch untersucht.

Es konnten in den Ampullen das Sinnesepithel, die Übergangszone, die Dunkelzellzone und das Planum semilunatum unterschieden werden, bei der Papilla neglecta war neben dem Sinnesepithel nur die Dunkelzellzone zu erkennen.

Im Utriculus war Sinnesepithel, perimaculäre Randzone und die Dunkelzellzone vorhanden. Diese fehlte bei der Macula sacculi, bei der Macula lagenae war nur das Sinnesepithel zu erkennen.

Bei der Papilla basilaris der Cochlea konnte zwischen Sinnesepithel und äußeren und inneren homogenen bzw. hyalinen Zellen unterschieden werden.

In allen Sinnesepithelien traten bei allen Nachweisreaktionen enzymatische Aktivitäten auf, die bei den einzelnen Enzymen unterschiedlich stark waren.

Eine deutliche Polarisation zwischen apikalem und basalem Sinnesepithelbereich war nicht zu erkennen.

Die Übergangszone der Ampullen verhielt sich in der Reaktionsintensität wie das Planum semilunatum und die Dunkelzellzone. Diese drei Bezirke zeigten insgesamt die stärksten Anfärbungen. Im Utriculus wies die perimaculäre Randzone eine geringere Reaktion auf als das Sinnesepithel und die Dunkelzellzone.

In der Cochlea war das Tegmentum vasculosum am stärksten tingiert, gefolgt vom Sinnesepithel und den homogenen und hyalinen Zellen. Eine sehr starke Anfärbung wies eine Zellgruppe am Boden der Scala tympani auf.

Macula- und Cupulagallerte sowie Otolithenmembran zeigten keinerlei Reaktion.

Die Enzyme des Citratcyclus ICDH, MDH und SDH waren im planum semilunatum, der Dunkelzellzone, der Übergangszone und im Tegmentum vasculosum in starker Konzentration vorhanden, im Sinnesepithel war der Nachweis auf SDH nur schwach positiv.

Das Enzym der anaeroben Glykolyse LDH wies in allen Epithelien eine starke Aktivität auf, mit besonderer Betonung der apikalen Sinnesepithelbereiche. So scheint die anaerobe Glykolyse diesen Zellen die notwendige Energie zu liefern.

Alle Epithelbezirke scheinen zur Nucleinsäurebiosynthese und Steroidproduktion befähigt zu sein, da sich G-6-PDH sicher nachweisen ließ.

Von den Enzymen des Aminosäurestoffwechsels MDH und GlDH und den Proteasen zeigten die basalen Sinnesepithelbereiche eine mittelstarke bis starke Reaktion, was auf eine sekretorische Aktivität auch der Stützzellen hinweisen könnte.

6 LITERATURVERZEICHNIS

BAIRATI, S. und IURATO, S.: The ultrastructure organisation of "plana semilunata"
Exp. Cell. Res. 2o, 77 - 83 (196o)

BEKESY, G. von: Über die mechanische Frequenzanalyse in der Schnecke verschiedener Tiere
Akust. Zeitschr. 9, 3 - 11, (1944)

BORGHESAN, E.: Glandular structures in the planum semilunatum
Acta oto-laryng.(Stockh.) 53, 285 - 289 (1961)

BORGHESAN, E.: The reticular zone of the "planum semilunatum"
Acta oto-laryng.(Stockh.) 54, 27 - 32 (1962)

BRODMANN, G.: Histochemische Untersuchungen zur Funktion und Verteilung der Boettcherschen Zellen in der Goldhamstercochlea
Dissertation, Tübingen (1977)

BRODMANN, G. und GIEBEL, W.: Histochemische Untersuchungen zur Funktion und Verteilung der Boettcherschen Zellen in der Goldhamstercochlea
Arch. oto-rhino-laryng. 22o, 1o5 - 12o (1978)

BRUDER, A.: Enzymhistochemische Untersuchungen über das Innenohr von Salmo trutta
Dissertation, Tübingen (1978)

BURLET, H.M. DE: Die innere Ohrsphäre
In: Handbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere
ed. L.BOLK, E.GÖPPERT, E.KALLIUS, W.LUBOSCH
Urban & Schwarzenberg, Berlin und Wien, Bd.2, 2. Hälfte 1293 - 138o (1934)

BURSTONE, M.S.: The cytochemical localisation of esterase
J. nat. Cancer Inst. 18, 167 - 172 (1957)

CASSERIUS, J.: De vocis auditusque organis historia
anatomica Ferrariae (16oo) (Nach Tiedemann)

DOHLMANN, G.F.: Secretion and absorption of endolympf
Ann. Otol. (St.Louis) 73, 7o8 - 723 (1965)

DOHLMANN, G.F.: Mechanismus des Ionenaustausches, der
Sekretion und Exkretion bei der Taube
Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.- u. Kehlk.- Heilk.
194, 4oo - 4o6 (1969)

DOHLMANN, G.F., ORMEROD, F.C. and Mc LAY, K.: The mecha-
nism of secretion and absorption of endolymph in
the vestibular apparatus.
Acta oto-laryng. (Stockh.) 59, 275 - 285 (1965)

FARNER, S. und KING, J.: Avian Biology, Vol I - V,
Acad. Press, New York and London (1973)

FREYE-ZUMPFE, H.: Befunde am Mittelohr der Vögel
Wiss. Z. Univ. Halle-Wittenberg 2, 445 - 461
(1952 - 1953)

FRIEDMAN, I.: The chick embryo otocyst in tissue culture:
A model ear
J. laryngol. otol. 82, 185 - 2o1 (1968)

GADOW, H.: Vögel in Bronns Klassen und Ordnungen der Tiere
Bd. 6, Abt. 4, T.I., 459 - 471 (1891)

GERHARDT, H.J.: Zur Lokalisation der Glucose-6-Phosphat-
und der Gluconat-6-Phosphat-Dehydrogenase in der
Meerschweinchenschnecke
Arch. Ohr.- Nas.- u. Kehlk.- Heilk. 184, 52 - 56
(1964)

GIEBEL, W.: Dehydrogenasen in der lateralen Cochleawand
des Goldhamsters (Mesocricetus auratus Waterhouse)
Arch. Oto-rhino-laryng. 217, 69 - 79 (1977)

GIEBEL, W. und PLESTER, D.: Enzymhistochemische Untersuchungen zur Funktion der Wurzelzellen
Arch. klin. exp. Ohr-, Nas.- u. Kehlk. Heilk. 199, 66o - 663 (1971)

GOGNIASVILI, O.S.: Histochemische Untersuchungen des Cortiorganes der Vögel unter den Bedingungen einer Toneinwirkung
Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 3, 272 - 275 (1967)

GRIFFIN, D.R.: Acoustic orientation in the oil bird Steatornis. Proc. Nat. Acad. Sci.U.sS. 39, 884 - 893 (1953)

HAGMANN, B.: Enzymhistochemische Untersuchungen am Innenohr des Frosches (Rana Tempraria)
Dissertation, Tübingen (1977)

HAGMANN, B., GIEBEL, W.: Enzymhistochemische Untersuchungen am Innenohr des Frosches (Rana temporaria)
Arch. Oto-Rhino-Laryng. 22o, 89 - 1o3 (1978)

HARPER, H.A., LÖFFLER, G., PETRIDES, P.E. und WEISS, L.: Physiologische Chemie
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1975)

HASSE, C.: Zur Morphologie des Labyrinthes der Vögel
Anat. Studien, 24. Heft, Nr. VI (1871)

HAZAMA, O.: Die absondernden Zellelemente des Wirbellabyrinthes
Z. ges. Anat., 1. Abt. 88, 223 - 261 (1929)

HELD, H.: Die Cochlea der Säuger und der Vögel, ihre Entwicklung und ihr Bau.
In "Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie" (Bethe, v. Bergmann, Emden, Ellinger, eds.) Vol. XI, Part 1, pp. 466 - 534. Springer-Verlag, Berlin und New York (1926)

ISHIYAMA, E., CUTT, R.A. and KEELS, E.W.: Succinic dehydrogenase in the pigeon ampulla
Arch. Oto-Laryng. 9o, 574 - 58o (1969)

ISHIYMA, E., CUTT, R.A. and KEELS, E.W.: Ultrastructure of the tegmentum vasculosum and transitional zone
Ann. Otol. (St. Louis) 79, 998 - 1oo9 (197o)

IWATA, N.: Labyrinth der Fledermaus
Aichi J. exp. Med. 1, 42 - 112 (1924)

JAHNKE, V., LUNDQUIST, P.G. and WERSÄLL, J.: Some morphological aspects of sound perception in birds
Acta oto-laryng. (Stockh.) 67, 583 - 6o1 (1969)

IURATO, S.: Submikroskopic structure of the membranous labyrinth
Z. Zellforsch. 52, 1o5 - 128 (196o)

KIMURA, R., LUNDQUIST, P.G. and WERSÄLL, J.: Secretory epithelial linings of the guinea-pig labyrinth
Acta oto-laryng. (Stockh.) 57, 518 - 53o (1964)

KRAUSE, R.: Mikroskopische Anatomie der Wirbeltiere in Einzeldarstellungen. II: Vögel und Reptilien, 1922, Berlin, Leipzig

LÖWENSTEIN, O., OSBORNE, M.P. and WERSÄLL, J.: Structure and innervation of the sensory epithelia of the labyrinth in Thornback ray (Raja clavata)
Proc. Royal Society, London, 16o, 1 - 12 (1964)

LÜDTKE, H. und SCHÖLZEL, H.: Die Morphogenese der Cristae im Labyrinth des Hühnchens
Zool. Jahr. Abt. Allg. Physio. Tiere 72, 291 - 3o8 (1966)

MAZO, J.B.: Der Mikrophoneffekt der Schnecke als Mittel zur Untersuchung der funktionellen Entwicklung des peripheren Gehörorganes
Probl. Fiziol. Akust. 3, 95 - 1o1 (1955)

MIRA, E. und Dal NEGRO, F.: Die histoenzymologischen Eigenschaften des Epithels der Übergangszone der Cristae ampullaris
Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.-, u. Kehlk. Heilk. 193, 322 - 328 (1969)

NAKAI, Y. and HILDING, D.: Vestibular endolymphproducing epithelium
Acta oto-laryng. (Stockh.) 66, 12o - 128 (1968)

NOMURA, Y.: The capillary in the human vestibular labyrinth A histochemical staining technique.
Ann. Otol. (St. Louis) 68, 122o - 1226 (1959)

NOMURA, Y. and BALOGH, K.J.: Metabolic pathways in the vestibular labyrinth as revealed by histochemical technics
Acta oto-laryngol. 57, 484 - 492 (1964)

PEARSE, A.G.E.: Histochemistry, theoretical and applied
J. and A. Churchill, London (1961)

PEARSE, A.G.E.: Histochemistry, theoretical and applied
3. Edition, Vol. 1,
J. and A. Churchill, London (1968)

PERRAULT, C.: Traité de bruit.
Paris (168o)

PLESTER, D.: Autoradiographische Untersuchungen des Eiweißstoffwechsels in der Schnecke
Arch. Ohr.- Nas.- u. Kehlk.- Heilk. 176, 668 - 672 (196o)

PLESTER, D., KOBURG, E. und HEMPEL, K.: Autoradiographische Untersuchungen des Eiweißstoffwechsels der verschiedenen Gewebe des Innenohres
Ann. Histochim. Suppl. 2, 91 - 96 (1962)

PUMPHREY, R.J.: The sense organs of birds
Smithson. Inst., Annu. Rep. pp 3o5 - 33o (1949)

QUADE, R. u. GEYER: Der Succinatdehydrogenase-Nachweis mit Hilfe der Perfusionstechnik an der Cochlea des Meerschweinchens unter Normalbedingungen und Dauerlärmeinwirkung
Acta oto-laryng. (Stockh.) 75, 45 - 54 (1973)

RAUCHBACH, E. and ARENBERG, I.K.: Scanning electron microscopic observations of the cilia in the sensory epithelia of the inner ear of the lemon shark, Negaprion brevirostris
Anat. Rec. 172, 39o (1972)

RETZIUS, G.: Das Gehörorgan der Wirbeltiere
Samson und Wallin, Stockholm (1881)

RUDERT, H.: Lichtmikroskopische Untersuchungen an der Crista ampullaris des Meerschweinchenlabyrinths
Z. Zellforsch. 7o, 48o - 498 (1966)

SCHÄTZLE, W.: Histochemie des Innenohres.
Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien (1971)

SCHÄTZLE, W. und B. VON WESTERHAGEN: Zur Fermentausstattung des peripheren Vestibularisapparates.
Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.- und Kehlk.- Heilk. 186, 29o - 297 (1966)

SCHÖLZEL, H. und LÜDTKE, H.: Die Entwicklung der Cupula im Labyrinth des Hühnchens
Zool. Jahrb. Abt. Allg. Physiol. Tiere 74, 164 - 177 (1967)

SCHWARTZKOPFF, J. und WINTER, P.: Zur Anatomie der Vogel-Cochlea unter natürlichen Bedingungen
Biol. Zentralbl. 79, 6o7 - 625 (196o)

SCHWERT, G.W., NEURATH, H., KAUFMAN, S. and SNOKE, J.E.: The specific esterase activity of trypsin.
J. biol. Chem. 17, 221 - 239 (1948)

SNAPP, C.F.: Blood supply in the labyrinth of birds
Anat. Rec. 27, 29 - 45 (1924)

SPOENDLIN, H.: Über die Polarisation der vestibulären Sinnesepithelien
Pract. oto-rhino-laryng. 26, 418 - 432 (1964)

SPOENDLIN, H., BALOGH, K.JR.: Histochemische Darstellung von Dehydrogenasen in der Schnecke lebender Tiere
Arch. Ohr.- Nas.- u. Kehlk.- Heilk. 182, 579 - 582 (1963 a)

STELLBOGEN, E.: Über das äußere und mittlere Ohr des Waldkauzes
Z. Morphol. Oekol. Tiere 19, 686 - 731 (193o)

STREIFENSAND, K.: Untersuchungen über die Ampullen
Müllers Arch. Anat. Physiol. wiss. Med. Berlin, 171 - 189 (1835)

STRESEMANN, E.: Sawropsida, Aves. In "Handbuch der Zoologie" (W.G. Kükenthal und Krumbach, eds.)
Vol VII, Teil 2, de Grayter, Berlin (1934)

TAKASAKA, T. and SMITH, C.A.: The structure and innervation of pigeon's basilar papilla
J. Ultrastruct. Res. 35, 2o - 65 (1971)

THORPE, W.H.: "Bird song"
Cambridge Univ. Press, London and New York (1961)

VOSTEEN, N.: Die Energieproduktion im Cortischen Organ
Acta oto-laryng. (Stockh.) Suppl. 163, 54 - 55 (1955)

WEBSTER, D.B. und STACK, C.R.: Comparative histochemical investigation of the organ of Corti in the kangaroo rat, gerbil and guinea pig
J. Morphol. 126, 413 - 434 (1968)

WERNER, C.F.: Die Otolithen im Labyrinth der Vögel, besonders beim Star und der Taube
J. Ornithol. 87, 1o - 23 (1939)

WERNER, C.F.: Der Canaliculus (Aquaeductus) cochleae und seine Beziehungen zu den Kanälen des IX. und X. Hirnnerven bei den Vögeln
Zool. Jahr. Abt. Anat. Ontog. Tiere 77, 1 - 8 (1958)

WERNER, C.F.: Die Differenzierung der Maculae im Labyrinth der Wirbeltiere
Laryng. Rhinol. Otol. 53, 2o9 - 212 (1974)

WERSÄLL, J.: Studies of the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullares in guinea-pig
Acta oto-laryng. (Stockh) Suppl. 126, 1 - 85 (1956)

WERSÄLL, J.: Cristae ampullares, Vestibularganglion.
In: JURATO et al.: Submikroskopic structure ot the inner ear
Pergamon Press, Oxford (1967)

WEVER, E.G.: Tectorial reticulum of the labyrinthine endings of vertebrates
Ann. Otol. (St. Louis) 82, 277 - 289 (1973

Herrn Professor Dr. D. Plester danke ich sehr für die Überlassung dieses Themas und das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Dr. Werner Giebel danke ich sehr herzlich für seine freundliche Unterstützung und für seinen hilfreichen Rat bei der Planung und Durchführung der Experimente.

Fräulein Gehring danke ich für die Ausführung der Fotoarbeiten.

Frau Kipp danke ich für die Ausführung der Schreibarbeiten.

LEBENSLAUF

Am 21.8.1952 wurde ich, Leonhard Buhl, als Sohn des Johannes Buhl, Landwirt, und seiner Ehefrau Maria Buhl in Leinstetten geboren.

1959 trat ich in die Katholische Volksschule Leinstetten ein. Vom 7.4.1964 an besuchte ich das humanistische Albertus-Magnus-Gymnasium in Rottweil. Dort bestand ich am 22.6.1972 das Abitur. Während meiner Gymnasialzeit wohnte ich zuerst im dortigen Eucharistinerjuvenat St. Michael, später dann im Bischöflichen Konvikt.

Am 16.1o.1972 begann ich das Studium der Zahnheilkunde an der Universität Tübingen. Am 27.9.1973 bestand ich das Vorphysikum, am 14.4.1975 das Physikum.
Im Frühjahr nahm ich vorliegendes Dissertationsthema an und beschäftigte mich zunächst ausschließlich mit der Literatur. Die Prüfungen des Staatsexamens dauerten vom 19.7.1977 bis zum 7.12.1977. Im Frühjahr 1978 machte ich den praktischen Teil zu meiner Dissertation.

Am 3.4.1978 trat ich eine Assistentenstelle in Aidlingen an. Am 21.9.1978 heiratete ich und wurde am 22.6.1979 Vater eines Sohnes.

Nach Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde beabsichtige ich, eine Zahnarztpraxis zu eröffnen.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (07472) 22145